

Aus dem Institut für  
Physikalische und Medizinische Strahlenkunde  
der Universität Erlangen - Nürnberg  
Vorstand: Prof. Dr. med. , Dr. phil. nat. H. Pauly

---

# Über die Wärmedenaturierung von Lactat- dehydrogenase nach Röntgenbestrahlung

## Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von  
**Armin Eberhard Werner**  
aus Großsteinberg



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41548410\\_0022](https://archive.org/details/IA41548410_0022)





Aus dem Institut für  
Physikalische und Medizinische Strahlenkunde  
der Universität Erlangen - Nürnberg  
Vorstand: Prof. Dr. med. , Dr. phil. nat. H. Pauly

---

# Über die Wärmedenaturierung von Lactat- dehydrogenase nach Röntgenbestrahlung

## Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Armin Eberhard Werner

aus Großsteinberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der  
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Referent: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 13.3.1973

| Gliederung                                                                      | Seite   |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1. Einleitung und Problemstellung                                               | 1 - 2   |
| 2. Methodik                                                                     | 3 - 11  |
| 2.1. Präparat                                                                   | 3       |
| 2.2. Bestimmung der enzymatischen Aktivität                                     | 3 - 4   |
| 2.3. Bestrahlung                                                                | 4 - 7   |
| 2.4. Dosimetrie                                                                 | 7 - 9   |
| 2.5. Temperaturinaktivierung                                                    | 9 - 11  |
| 3. Ergebnisse                                                                   | 12 - 37 |
| 3.1. Eigenschaften der LDH                                                      | 12 - 26 |
| 3.1.1. Bestimmung der enzymatischen Aktivität                                   | 12 - 19 |
| 3.1.1.1. pH-Optimum                                                             | 12 - 13 |
| 3.1.1.2. Pyruvat-Konzentration                                                  | 14 - 17 |
| 3.1.1.3. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration   | 17 - 19 |
| 3.1.2. Bedingungen für die thermische Inaktivierung                             | 20 - 26 |
| 3.1.2.1. Abhängigkeit der Enzym-Inaktivierung vom pH-Wert des Puffers           | 20 - 22 |
| 3.1.2.2. Abhängigkeit der Enzym-Inaktivierung von der Enzymkonzentration        | 23 - 25 |
| 3.1.2.3. Abhängigkeit der Enzym-Inaktivierung von der Konzentration des Puffers | 25 - 26 |
| 3.2. Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Röntgenstrahlendosis      | 27 - 29 |
| 3.3. Kinetik der Wärmeinaktivierung                                             | 29 - 37 |
| 4. Analyse der Ergebnisse                                                       | 38 - 47 |
| 5. Diskussion                                                                   | 48 - 51 |

6. Zusammenfassung

52 - 53

7. Literatur

54 - 57

## 1. Einleitung und Problemstellung

Wenn man lebende und teilungsfähige Zellen ionisierenden Strahlen aussetzt, so werden schon nach relativ kleinen Strahlendosen diese die Zellteilung einstellen und nach größeren Strahlendosen schließlich absterben. Diesen auch praktisch wichtigen strahlenbiologischen Prozessen liegen strahlenchemische Folgereaktionen auf der Ebene des intermediären Stoffwechsels zugrunde (5, 30). Wenn auch diese Prozesse im einzelnen noch relativ unbekannt sind, so darf man doch annehmen, daß die Substanzen zur Verringerung oder auch Erhärtung der Strahlensensibilität ebenfalls auf der metabolischen Ebene eingreifen. Ebenfalls sollten sich die zellulären Vorgänge der Erholung von Strahlenschäden im intermediären Stoffwechsel abspielen (16).

Daß Enzymproteine, die eine Bestrahlung ohne sichtbaren Verlust der enzymatischen Aktivität überstanden haben, sich durch eine nachfolgende, normalerweise wirkungslose Behandlung in ihren biochemischen und physikochemischen Eigenschaften verändern lassen, ist erst in den letzten Jahren genauer untersucht worden. So haben WOHLHIETER et al. (39) gezeigt, daß der noch infektiöse Bruchteil der Ribonukleinsäure von Tabakmosaikvirus nach Röntgenbestrahlung hitzelabiler ist als unbestrahlte Ribonukleinsäure. EJDUS und Mitarbeiter (8, 9, 10, 11, 12, 21, 37) konnten ähnliche Effekte an Pepsin und Myosin nachweisen. Ebenfalls fand SETLOW (29) eine Wärmelabilisierung der Katalase nach Einwirkung von Deuteronen. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei der Invertase, wie EGGERT und PAULY (7, 27) feststellen konnten. Das Enzym Invertase, das nach Röntgenbestrahlung von Trockenhefe und einer Dosis von 20 Mrd "überlebt", d. h. seine enzymatische Aktivität noch nicht eingebüßt hat, muß schon erhebliche

strukturelle Veränderungen erlitten haben. Diese "latenten Läsionen" sind die Ursache dafür, daß der eine Bestrahlung "überlebende" Teil des Enzympräparates etwa 1000 mal schneller hitzeinaktiviert wird als das native und unbestrahlte Invertasepräparat.

In der vorliegenden Arbeit wurden entsprechende Untersuchungen an einem wohlbekannten Enzym, der Lactatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel, durchgeführt. Es handelte sich um ein weitgehend gereinigtes Präparat, das vorwiegend aus dem Isoenzym V besteht. Eine reaktionskinetische Analyse legt nahe, daß die durch Röntgenbestrahlung verursachten "latenten Läsionen" als eine Art "Prädenaturierung" aufgefaßt werden können, da für die nach Bestrahlung folgende Wärmedenaturierung nur eine wesentlich geringere Aktivierungsenergie aufgewendet werden muß.

## 2. Methodik

### 2.1. Präparat

Das Enzym Lactatdehydrogenase (im weiteren abgekürzt mit LDH) wurde von der Firma Boehringer/Mannheim bezogen. In den verwendeten Chargen betrug die Konzentration 10 mg Enzymprotein/ml. Die LDH lag als Kristallsuspension in einer 2,2 M Ammoniumsulfat-Lösung bei pH 7,0 vor.

Die in den Experimenten untersuchte LDH stammt aus dem Skelet-Muskelgewebe des Kaninchens. Aus physikochemischen Untersuchungen weiß man, daß die LDH aus diesem Gewebe zum größten Teil aus dem Isoenzym V besteht. Verschiedene Autoren zeigten, daß dieses Isoenzym wesentlich hitzelabiler ist als das in nur geringem Maße (~6 %) vorhandene Isoenzym I. Die restlichen Isoenzyme fallen von ihrer enzymatischen Aktivität her nicht ins Gewicht. Ihr Gewichtsanteil betrug nur etwa 1 bis 2 %.

#### Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Die LDH katalysiert den Umsatz von Pyruvat in Lactat und umgekehrt. Wasserstoffdonator bzw. -acceptor ist das Coenzym  $\text{NADH} + \text{H}^+$  bzw. NAD.



Die Enzymaktivität wurde wie üblich auf den Umsatz von Pyruvat in Lactat bezogen und mit dem optischen Test nach WARBURG gemessen. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von Pyruvat. Meßgröße war die

mit dem Eppendorf-Photometer bei 334 nm gemessene Abnahme der  $\text{NADH} + \text{H}^+$  - Extinktion pro Zeiteinheit. Gemessen wurde sie bei einer Pyruvat- und NADH-Konzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit zeitlich konstant war.

Die enzymatische Aktivität wurde definiert durch den Quotienten - mit A-Wert bezeichnet -

$$A = \frac{\text{Abnahme der Extinktion bei 334 nm pro Minute}}{\text{Konzentration der LDH in der 1 cm-Küvette in mg/ml}}$$

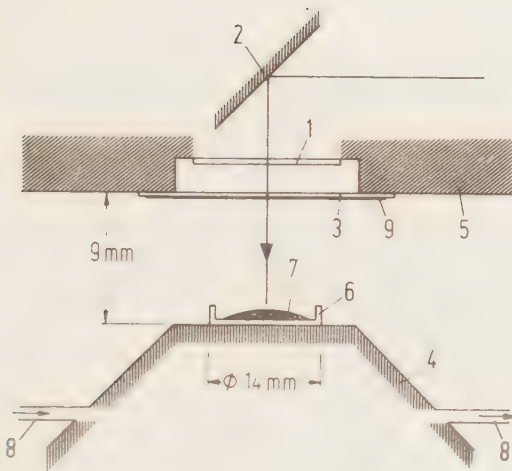
Bei der enzymatischen Aktivitätsmessung wurden folgende Parameter konstant gehalten:

1. Testvolumen (3,1 ml),
2. pH-Wert (pH 7.4),
3. Pyruvatkonzentration ( $1.26 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ),
4. ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ )-Konzentration ( $1.6 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ),
5. Puffer ( $\text{M}/15$  Na-Phosphat-Puffer) und
6. Temperatur ( $25^\circ\text{C}$ ).

## 2.4. Bestrahlung

Die Bestrahlung wurde mit einer AGW-61-Röntgenröhre der Firma Siemens ausgeführt. Das Strahlenaustrittsfenster, das 1 mm dick war, bestand aus Beryllium. Diesem wurde als Zusatzfilter eine 0,1 mm dicke Aluminiumfolie und eine 10  $\mu\text{m}$  dicke Hostafan-Folie vorgeschaltet, die sich in bezug auf das Strahlenaustrittsfenster immer in einer fest gewählten Entfernung befand.

Die folgende, aus den Abb. 1 a und 1 b ersichtliche Bestrahlungsanordnung wurde gewählt:



- |                       |                                           |
|-----------------------|-------------------------------------------|
| 1 Berylliumfenster    | 5 Röntgenröhrenhaube                      |
| 2 Anode               | 6 Plastikschalchen                        |
| 3 Aluminiumfolie      | 7 LDH - Kristallsuspension                |
| 4 Messingprobenhalter | 8 Kühlung der Messing-<br>probenhalterung |
| 9 Hostafan - Folie    |                                           |

Abb. 1 a: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Bestrahlung.

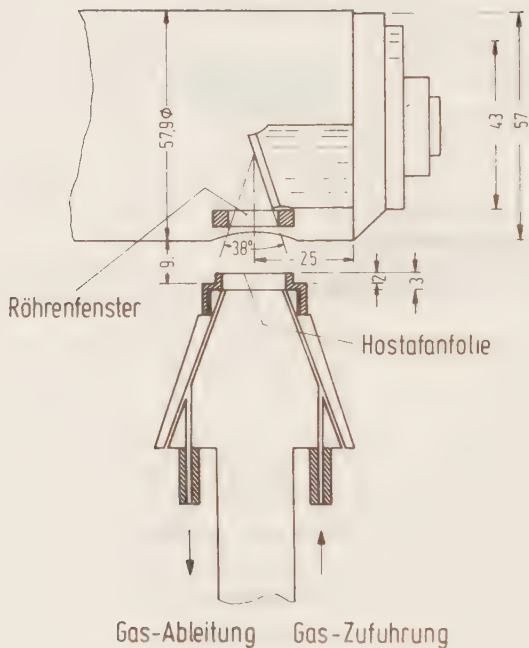


Abb. 1 b: Versuchsaufbau mit Röhre und Probenhalterung;  
maßstabgerecht.

Der Messingprobehälter befand sich in 10 mm Entfernung von der Röhrenkante. Mit einem Kryostaten wurde der Messingprobehälter gekühlt. Auf den Messingprobehälter wurde dann das Plastikprobeschälchen gesetzt. In dieses wurde mit einer Mikroliterpipette Eppendorf 0,1 ml der 1 %igen Kristallsuspension pipettiert. Die Temperatur in dieser Kristallsuspension,

gemessen mit einem Telethermometer der Firma Yellow Spring Instruments, Model 42 SC, und einem kleinen flexiblen Fühler # 402, betrug  $6 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Die Schichtdicke dieser Kristallsuspension in dem Probeschälchen war immer  $< 1\text{ mm}$ .

Im Raum oberhalb der Probe befand sich gekühlte und wasserdampfgesättigte Luft.

## 2.4. Dosimetrie

Die mittlere Dosis in der Probe wurde aus der kalorimetrisch gemessenen Energieflußdichte  $\psi$  gewonnen (31). Die Energieflußdichte betrug unter den speziellen Bestrahlungsbedingungen (60 kV, 0.1 mm Al Zusatzfilter + 10  $\mu\text{m}$  Hostaphan als Probenabdeckung) für einen Abstand von 9 mm zwischen Röhrenunterseite und Probenmitte ( $\hat{=}$  38 mm Röhrenmitte - Probenmitte)<sup>+</sup>)

$$108 \cdot 10^{-3} \frac{\text{J}}{\text{sec} \cdot \text{cm}^2} .$$

Nach GLOCKER (14) besteht zwischen der Energieflußdichte und der Dosisleistung im Falle von Elektronengleichgewicht die Beziehung

$$(1) \quad \dot{D} = \frac{\eta}{\rho} \psi$$

wobei  $\eta$  den Energieumwandlungskoeffizienten und  $\rho$  die Dichte der betrachteten Probe bedeuten.

Sekundärelektronengleichgewicht<sup>++)</sup> wird für Elektronen von maximal 60 keV (eigentlich: Energie des einfallenden

<sup>+</sup>) Die Absorption von 0.1 mm Al beträgt bei 60 kV etwa 11,5 %.

<sup>++)</sup> eigentlich: "transient"-Elektronengleichgewicht.

den Quants minus Bindungsenergie) nach etwa  $0.5 \cdot 10^{-3}$  mm erreicht. Bei bekannten Massenenergieumwandlungskoeffizienten errechnet sich aus der Beziehung (1) die Dosis. Der Massenenergieumwandlungskoeffizient für  $2.2 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  folgt aus der Gleichung (2):

$$(2) \quad \frac{\eta}{\rho} = \left( \frac{\eta}{\rho} \right)_1 w_1 + \left( \frac{\eta}{\rho} \right)_2 w_2 + \dots$$

dabei bedeutet  $w_1, \dots, w_n$  die relativen Gewichtsanteile der einzelnen Elemente in der bestrahlten Probe (2).

Die relativen Gewichtsanteile wurden aus dem Atomgewicht der einzelnen Elemente und dem experimentell bestimmten spezifischen Gewicht der Lösung ermittelt ( $\rho_{\text{Lösung}} = 1,133 \text{ kg/l}$ ). Die Energieumwandlungskoeffizienten der einzelnen Elemente wurden dem NBS Handbook 85 (26) entnommen. Die effektive Energie der verwendeten Strahlung lag zwischen 16 und 17 keV. Für diese Strahlenqualität erhält man für die  $2.2 \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  als Energieumwandlungskoeffizienten einen Wert von  $1.5 \text{ cm}^2/\text{g}$ . Die Dosis errechnet sich damit zu

$$\begin{aligned} D &= 1.5 \frac{\text{cm}^2}{\text{g}} \cdot 108 \cdot 10^{-3} \frac{\text{J}}{\text{sec} \cdot \text{cm}^2} = \\ &= 1.6 \cdot 10^6 \frac{\text{erg}}{\text{g} \cdot \text{sec}} = 16 \cdot 10^3 \frac{\text{rad}}{\text{sec}} . \end{aligned}$$

Der Dosisabfall über eine Schicht von 1 mm beträgt etwa 15 %<sup>4)</sup>. Damit ergibt sich eine mittlere Dosis von  $15 \cdot 10^3 \text{ rad/sec}$ .

<sup>4)</sup> Messungen in Plexiglas haben gezeigt, daß der Abfall über eine Schicht von 1 mm gut durch eine Gerade angenähert werden kann.

Dieser Wert wurde bestätigt durch die Messung der in Plexiglas absorbierten Energie und Umrechnung auf die Dosis in  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  über das Verhältnis der Energieumwandlungskoeffizienten.

## 2.5. Temperaturinaktivierung

Der gesamte Vorgang der Temperaturinaktivierung bis zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

Die Temperaturinaktivierung fand in einem durch einen Thermostaten-Thermomix (II) der Firma Braun/Melsungen automatisch regulierten Wasserbad statt. Dünnwandige Reagenzgläser, mit 3 ml  $\text{M}/15$  Na-Phosphat-Puffer pH 6.3 gefüllt und mit Parafilm verschlossen, wurden etwa 5 Minuten vor Ausführung des Versuches in das Wasserbad gestellt. Nach Erreichen der Inaktivierungstemperatur wurde 0,1 ml LDH-Stammlösung mit einer "Mikroliterpipette Eppendorf" einpipettiert. Die Pipettierzeit lag dabei unter einer Sekunde. Nach Inaktivierungszeiten - variiert zwischen 15 Sekunden bis 2 Stunden - wurde die LDH-Lösung in einem V 4A-Stahlbecher schnell abgekühlt. Der V 4A-Stahlbecher wurde durch ein Eis-Wasser-Bad auf einer Temperatur von  $0^\circ\text{C}$  gehalten. Die wärmebehandelte LDH-Lösung wurde nach Abkühlung, die einige Sekunden dauerte, wieder in das inzwischen ebenfalls abgekühlte Probenröhrchen zurückgegossen und bis zur Aktivitätsbestimmung bei einer Temperatur von  $0^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Die Aktivitätswerte, die nach verschieden langer Einwirkung von Hitze auf die LDH-Lösung gemessen wurden, ergeben im Zeit-Enzymaktivität-Diagramm für verschie-

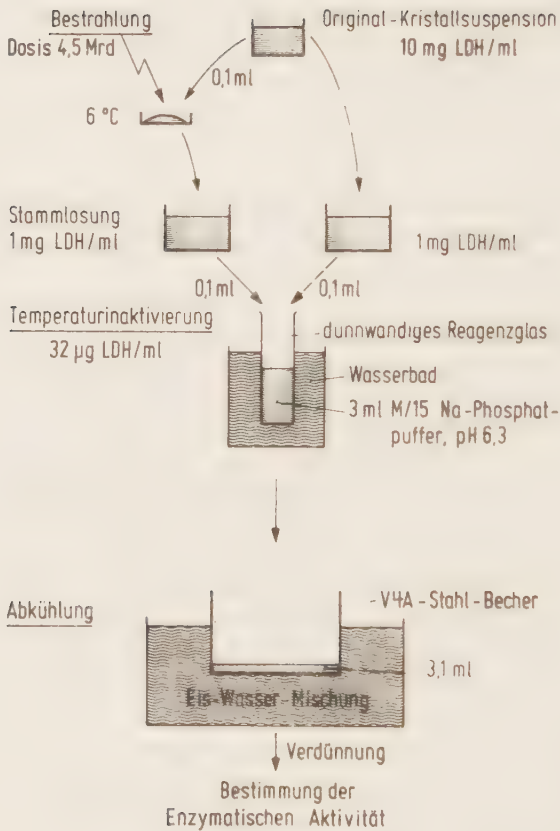


Abb. 2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

dene Temperaturen die sogenannten Temperaturinaktivierungskurven. Dabei wurde die Temperatur für die unbestrahlte, native LDH im Temperaturbereich von 50°C bis 68°C variiert, für die bestrahlte LDH im Bereich von 46°C bis 60°C. Bei der Temperaturinaktivierung betrug die Konzentration 32  $\mu$ g LDH pro ml <sup>M</sup>/15 Na-Phosphat-Puffer, pH 6.3.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Eigenschaften der LDH

##### 3.1.1. Bestimmung der enzymatischen Aktivität

##### 3.1.1.1. pH-Optimum

Die von der Lactatdehydrogenase katalysierte Hydrierungsreaktion von Pyruvat in Lactat wurde in ihrer Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht. Es wurde für diese Reaktion ein pH-Optimum bei 7,4 gefunden.

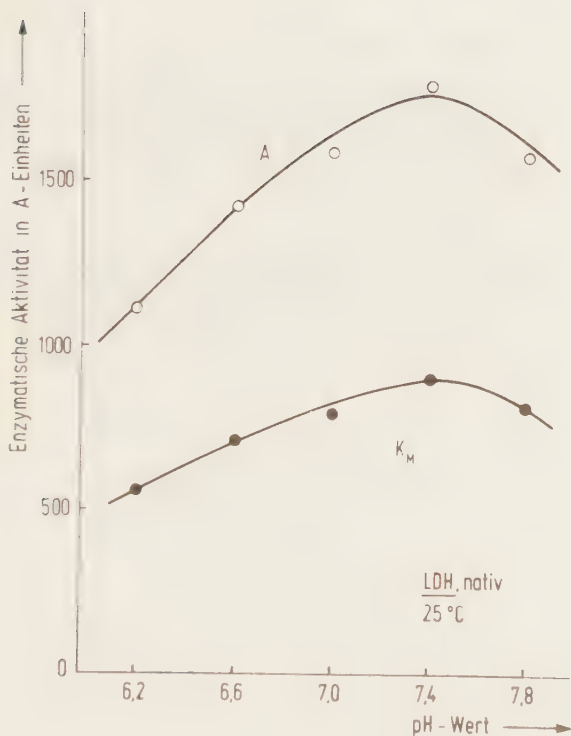


Abb. 3: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität in A-Einheiten vom pH-Wert des M/15 Na-Phosphat-Puffers. Temperatur 25°C. Gleichzeitig ist in willkürlichen Einheiten die Abhängigkeit der scheinbaren Michaeliskonstante  $K_M$  vom pH-Wert eingezeichnet. Siehe Text und Abb. 4.

### 3.1.1.2. Pyruvat-Konzentration

Um die optimale Substratkonzentration zu bestimmen, wurde die enzymatische Aktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt.

Die Reaktionsgeschwindigkeit bei konstanter Enzymkonzentration wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gemessen und in Abb. 4 dargestellt:

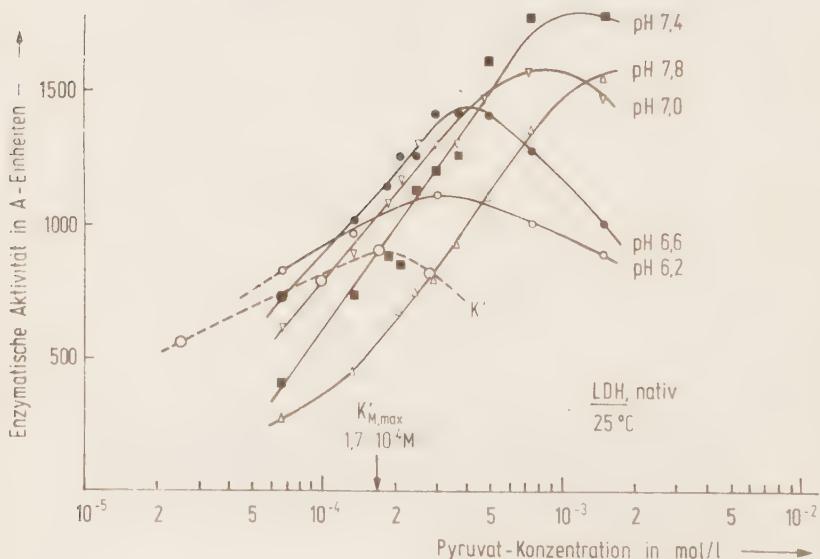


Abb. 4: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Pyruvat-Konzentration bei verschiedenen pH-Werten. Der dick durchgezogene Kurvenzug verbindet die 50 %-Werte der gemessenen maximalen Aktivität. Näheres siehe Text.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, wurde dieselbe Abhängigkeit auch bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Man erkennt, daß die maximalen Enzym-Aktivitäten bei einem pH-Wert von etwa 7,4 und einer Pyruvat-Konzentration von etwa  $1-2 \cdot 10^{-3}$  M gemessen wurden. Die im Abschnitt "Methodik" beschriebene Reaktionsmischung entsprach den hier gefundenen optimalen Bedingungen.

Nach der einfachen MICHAELIS-MENTON-Formel für die Abhängigkeit der Umsatzrate eines Enzyms hat die Michaelis-Konstante  $K_M$  den Zahlenwert für die Substratkonzentration, bei dem die Umsatzrate gerade die Hälfte der maximalen Umsatzrate beträgt. Identifiziert man zunächst die maximale Umsatzrate mit den Maximalwerten  $A_{\max}$  für die jeweiligen Kurven in Abb. 4, sucht dann auf jeder Kurve den 50 %-Wert von  $A_{\max}$  auf, so kann man diesen Wert als "scheinbare" Michaeliskonstante  $K_M'$  bezeichnen. Wie Abb. 4 zeigt, hängt der so bestimmte Wert von  $K_M'$  vom pH-Wert der Reaktionsmischung ab.  $K_M'$  ist in Abb. 3 in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen. Man erkennt aus Abb. 3, daß sowohl  $A_{\max}$  (Kurve A) als auch  $K_M'$  bei etwa pH 7,4 ein Maximum besitzen.  $K_{M,\max}'$  besitzt den Wert  $1,7 \cdot 10^{-4}$  mol/l.

Die gemessene und in Abb. 4 dargestellte Abhängigkeit der Umsatzrate (A) von der Pyruvatkonzentration entspricht jedoch im Bereich hoher Substratkonzentrationen nicht der Konzentrationsabhängigkeit, die auf

Grund der einfachen Formel von MICHAELIS und MENTON zu erwarten ist. Während nach MICHAELIS und MENTON die Umsatzrate bei hohen Substratkonzentrationen einem maximalen, von der Substratkonzentration unabhängigen Wert zustrebt, wird die gemessene Umsatzrate nach Überschreiten eines Maximums mit zunehmender Substratkonzentration - als Folge einer Substrathemmung - wieder kleiner. Der "wahre" Maximalwert wird nicht erreicht. Aus diesem Grunde sind die ermittelten  $K_M^1$ -Werte systematisch zu klein.

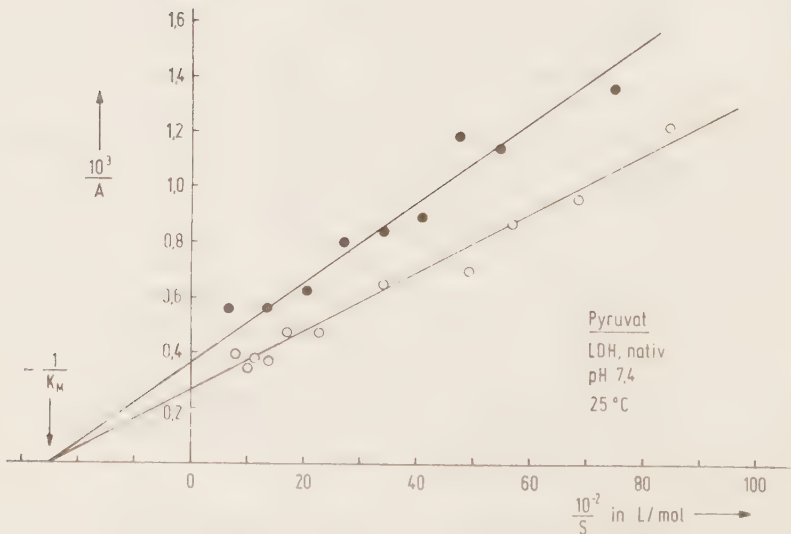


Abb. 5: LINEWEAVER-BURKE-Darstellung der Abhängigkeit der reziproken Umsatzrate von der reziproken Substratkonzentration für zwei unbestrahlte LDH-Proben.

Mit Hilfe der graphischen Methode von LINEWEAVER und BURKE und unter Verwendung der Meßwerte aus solchen Substratkonzentrationsbereichen, in denen die Substrathemmung praktisch keine Rolle spielt, lassen sich jedoch die Werte für die "wahre" Michaelis-Konstante  $K_M$  bestimmen. Eine entsprechende Analyse von zwei unbestrahlten LDH-Proben ist in Abb. 5 durchgeführt. Es ergibt sich bei pH 7,4 und 25°C ein Wert für  $K_M$  von  $4,4 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Für  $A_{max}$  ergibt sich ein Wert von etwa 3000. Beide Werte sind, wie erwartet, größer als die aus Abb. 4 ermittelten. Im Hinblick auf die dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung ist jedoch dieser Unterschied ohne Bedeutung.

### 3.1.1.3. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration

In dieser Arbeit wird - wie üblich - angenommen, daß die unter vergleichbaren Versuchsbedingungen gemessene zeitliche Extinktionsänderung linear von der in der Küvette befindlichen Enzymkonzentration abhängt. Die in den Abbildungen 6a und 6b dargestellten Ergebnisse zeigen, daß dies tatsächlich der Fall war, und zwar sowohl für native LDH (Abb. 6a) als auch für bestrahlte LDH (Abb. 6b). In letzterem Falle wurde - wie im Teil Methodik beschrieben - die Original-Kristallsuspension mit einer Dosis von 4,5 Mrd bestrahlt. Die Aktivität war danach auf einen Rest von 23 % abge-

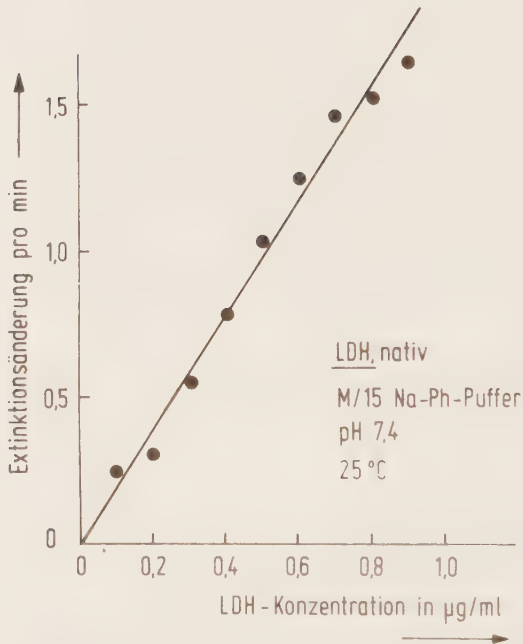


Abb. 6 a: Extinktionsänderung pro Minute für native LDH in Abhängigkeit von der LDH-Konzentration in der 1 cm-Küvette.  $M/15$  Na-Phosphatpuffer pH 7,4, Temperatur 25°C.

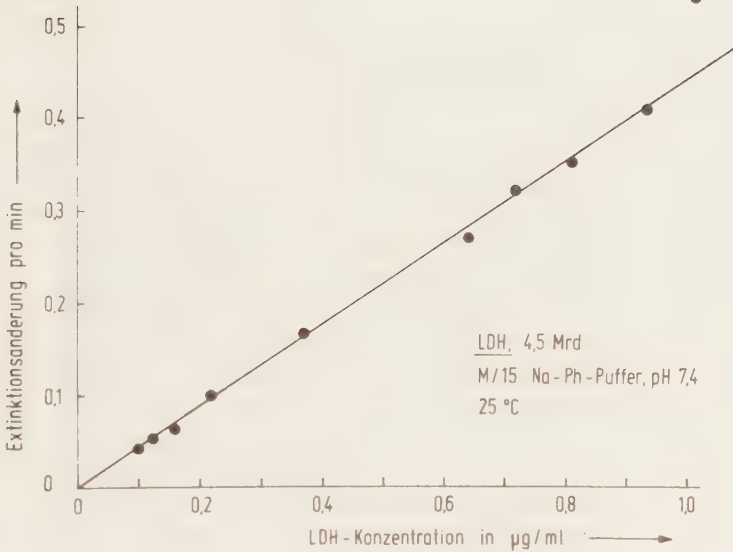


Abb. 6 b: Extinktionsänderung pro Minute für bestrahlte LDH in Abhängigkeit von der LDH-Konzentration in der 1 cm-Küvette. Dosis 4,5 Mrd; M/15 Na-Phosphatpuffer, pH 7,4; Temperatur 25°C. Weiteres siehe Methodik.

fallen. Eine lineare Abhängigkeit der zeitlichen Extinktionsänderung wurde auch bei anderen pH-Werten in der Küvette und anderen Pufferkonzentrationen gefunden.

### 3.1.2. Bedingungen für die thermische Inaktivierung

#### 3.1.2.1. Abhängigkeit der Enzym-Inaktivierung vom pH-Wert des Puffers

Es ist bekannt (18), daß die Stabilität eines Enzymproteins in Lösung vom pH-Wert abhängt. Die in den Abb. 7 und 8 dargestellten Versuchsergebnisse zeigen, daß auch die Stabilität der nativen wie der bestrahlten LDH vom pH-Wert der Lösung abhängt, in der die thermische Inaktivierung stattfand. Aus Abb. 7 geht hervor, daß z.B. bei einem pH-Wert von 7,8 die thermische Denaturierung bei allen drei verwendeten Temperaturen schneller abläuft als bei einem pH-Wert von 6,2. Bei einem pH-Wert von etwa 6,2 bis 6,4 ist das Enzymprotein relativ am stabilsten. Dieser Wert stimmt in etwa mit dem isoelektrischen Punkt der nativen LDH überein. Eine ähnliche pH-Abhängigkeit für thermische Stabilität wurde - wie aus Abb. 8 hervorgeht - bei bestrahlter LDH gefunden. Auch hier ist das Enzymprotein bei einem pH-Wert von etwa 6,3 am stabilsten, obwohl sich mit Hilfe der Gelchromatographie bereits strukturelle Änderungen nachweisen lassen (SCHÜSSLER 19, 20, 34).

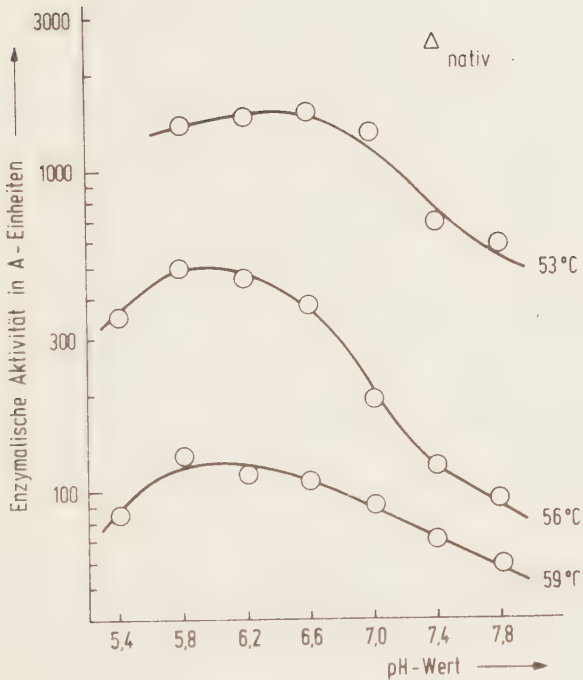


Abb. 7: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität vom pH-Wert. Drei unbestrahlte LDH-Proben wurden je 10 Minuten bei einer Temperatur von jeweils 53°C, 56°C und 59°C wärmeinaktiviert.

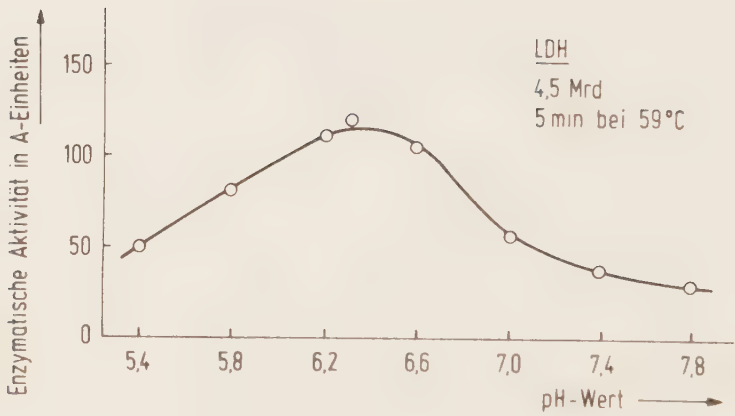


Abb. 8: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität einer bestrahlten und anschließend wärmeinaktivierten LDH vom pH-Wert.

### 3.1.2.2. Abhängigkeit der Enzym-Inaktivierung von der Enzymkonzentration

Vorversuche zeigten, daß das Ausmaß der Wärmeinaktivierung von der LDH-Konzentration während der Wärmebehandlung abhängt. Dies gilt sowohl für native wie für bestrahlte LDH. Das Ergebnis eines solchen Versuches ist in Abb. 9 dargestellt. Die in 2.2 M Ammoniumsulfat befindliche Original-Kristallsuspension mit 10 mg LDH pro ml wurde entweder sofort oder erst nach Bestrahlung in einem  $M/15$  Na-Phosphatpuffer, pH 6,3, so verdünnt, daß die in Abb. 9 bezeichnete LDH-Konzentration vorlag. Diese LDH-Lösungen wurden dann 10 Minuten bei einer Temperatur von  $59^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Die danach in üblicher Weise - siehe Methodik - gemessene Restaktivität ist in Abb. 9 aufgetragen. Man erkennt, daß im Bereich von relativ großer LDH-Konzentration, etwa zwischen 0,3 mg LDH/ml und 10 mg LDH/ml, die Inaktivierung um so geringer ist, je höher die LDH-Konzentration ist. In diesem Bereich ist jedoch die Ammoniumsulfat-Konzentration größer als die Konzentration des Puffers. Die größere Hitzestabilität des unbestrahlten und bestrahlten Enzymproteins dürfte auf die stabilisierende Wirkung der starken Salzlösung zurückzuführen sein.

Im Bereich der LDH-Konzentrationen unter 0,1 mg/ml hing das Ausmaß der Enzyminaktivierung praktisch nicht mehr von der Enzymkonzentration ab. In diesem Bereich kann die

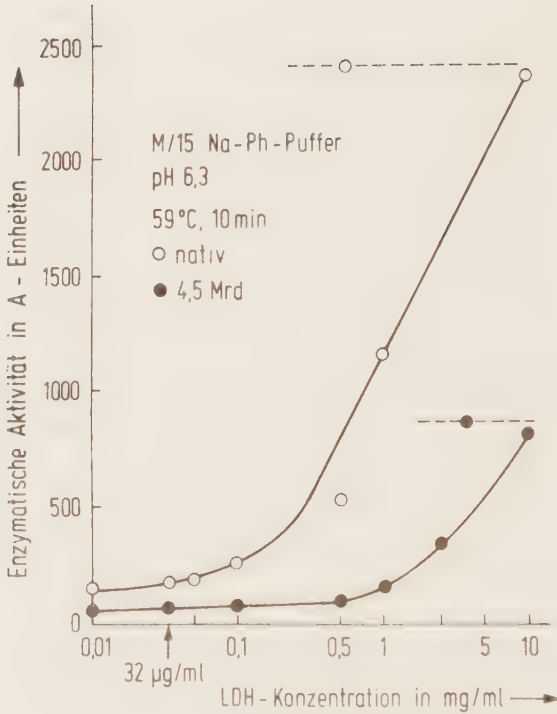


Abb. 9: Enzymatische Aktivität von unbestrahlter und bestrahlter LDH in Abhängigkeit von der Konzentration der LDH während der Wärmeinaktivierung. Die verschiedenen LDH-Proben wurden 10 Minuten bei einer Temperatur von 59°C in M/15 Na-Phosphatpuffer (und Ammoniumsulfat) bei pH 6,3 inaktiviert. Näheres siehe Text. Die gestrichelten Linien geben die A-Werte ohne Wärmebehandlung an.

Konzentration des Ammoniumsulfats gegen die nunmehr konstant  $M/15$  betragende Konzentration des Puffers vernachlässigt werden. Die in dieser Arbeit der Wärmebehandlung unterworfenene Enzymlösung besaß bei den Hauptversuchen eine Konzentration von  $32 \mu g$  LDH/ml (siehe Abb. 2). Die Wärmeinaktivierung wurde demnach unter vergleichbaren Bedingungen vorgenommen.

### 3.1.2.3. Abhängigkeit der Enzym-Inaktivierung von der Konzentration des Puffers

Der im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Versuch deutet bereits darauf hin, daß das Enzymprotein in konzentrierterer Salzlösung hitzestabiler ist. In Abb. 10 ist das Ergebnis eines entsprechenden Versuches aufgetragen. Unbestrahlte oder bestrahlte Original-Kristallsuspension wurde in Na-Phosphatpuffer, pH 6,3 von der in Abb. 10 auf der Abszisse angegebenen Pufferkonzentration gelöst. Die LDH-Konzentration betrug immer  $32 \mu g$ /ml. Anschließend wurden diese Lösungen 10 Minuten einer Temperatur von  $59^{\circ}C$  ausgesetzt. Die dann folgende Bestimmung der enzymatischen Restaktivität ergab die in Abb. 10 dargestellte Abhängigkeit der Temperaturinaktivierung von der Pufferkonzentration. Man erkennt, daß in einem Konzentrationsbereich oberhalb  $0,1 M$  Puffer das Enzymprotein um so hitzestabiler ist, je höher die Pufferkonzentration ist. Dies gilt sowohl für native wie für bestrahlte LDH.

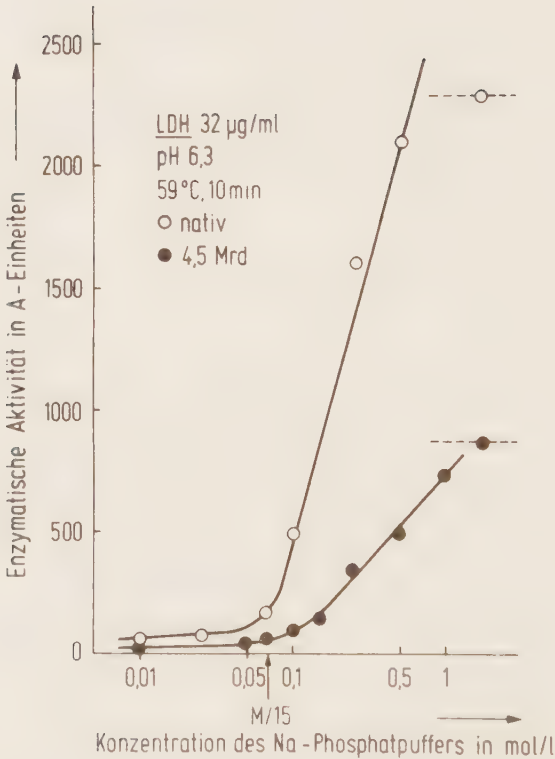


Abb. 10: Enzymatische Aktivität von unbestrahlter und bestrahlter LDH in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration während der Wärmeinaktivierung. Die nativen und bestrahlten LDH-Proben wurden bei einer Konzentration von 32 µg LDH/ml 10 Minuten bei einer Temperatur von 59°C in Na-Phosphatpuffer der jeweils angegebenen Konzentration inaktiviert. Die gestrichelten Kurven geben die A-Werte ohne Wärmebehandlung an.

### 3.2. Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Röntgenstrahlendosis

Aus der Literatur (6, 15, 19, 28, 29, 34, 38) kann man entnehmen, daß katalytischen Aktivität einer Probe von Enzymprotein, bestehend aus einer großen Anzahl von Enzymmolekülen, häufig exponentiell mit zunehmender Strahlendosis abnimmt. Dies gilt sowohl für Enzymlösungen als auch für Enzymprotein in trockenem Zustand. Auch die in lebenden Zellen befindlichen Enzyme zeigen fast immer die gleiche funktionelle Abhängigkeit ihrer Aktivität von der Strahlendosis. Das gleiche gilt für die LDH in der hier vorliegenden Kristallsuspension mit einer Konzentration von 10 mg LDH/ml in 2,2 M Ammoniumsulfat.

Es wurden jeweils 0,1 ml der Kristallsuspension, wie im Abschnitt Methodik beschrieben, mit Röntgenstrahlen bei einer Dosisleistung von 0,90 Mrd/min oder 150 W/kg bestrahlt und nach entsprechender Verdünnung die enzymatische Aktivität bestimmt.

In Abb. 11 ist die so erhaltene "Dosiseffektkurve" dargestellt. Sie ist exponentiell. Die Halbwertsdosis ( $D_{50}$ ) beträgt 2,15 Mrd. Die Inaktivierungsdosis ( $D_{37}$ ), d. h. die Dosis, nach der die enzymatische Aktivität noch 37 % der unbestrahlten Probe beträgt, hat einen Wert von 3,1 Mrd.

Die Inaktivierungsdosis hängt in gewissem Maße von der Menge der bestrahlten Kristallsuspension ab. Werden nur 0,05 ml bestrahlt, so erhält man ebenfalls eine exponentielle Dosiseffektkurve. Die Inaktivierungsdosis ist jedoch um den Faktor 1,57 kleiner als bei Bestrahlung von 0,1 ml LDH-Suspension. Eine stichhaltige Erklärung dieses Effektes kann zur

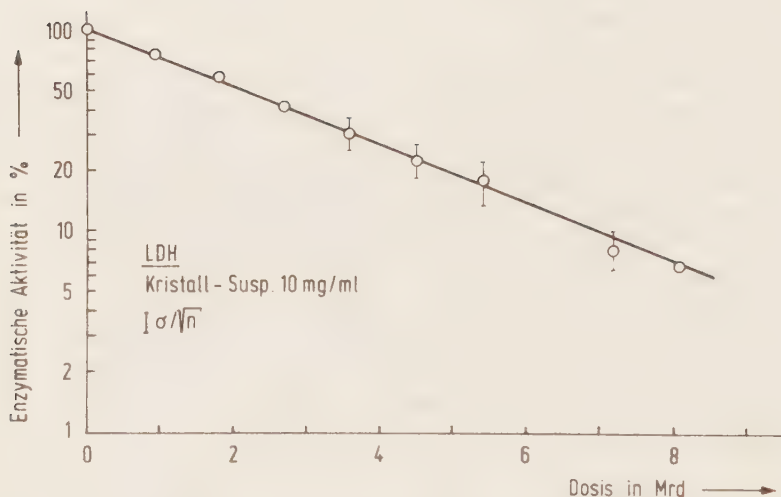


Abb. 11: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Röntgenstrahlendosis. Bestrahlungsbedingungen siehe Methodik. Es ist der Fehler der Einzelmessung aufgetragen.

Zeit nicht gegeben werden.

Für die Versuche zur Temperaturinaktivierung wurden immer Proben mit 0,1 ml der 1 %igen Originalkristallsuspension der Firma Boehringer/Mannheim 5 Minuten lang bestrahlt. Das entspricht einer absorbierten Dosis von 4,5 Mrd. Bei diesem absorbierten Energiebetrag zeigten etwa 75 - 80 % der LDH-Moleküle keine enzymatische Aktivität mehr. Die restlichen 20 - 25 % LDH-Moleküle wurden dann auf ihre Hitzeempfindlichkeit im Vergleich zu nativen LDH-Molekülen geprüft.

Bei einem mittleren  $\bar{A}$ -Wert von 550 und bei 45

Aktivitätsbestimmungen ergab sich ein Fehler der Einzelmessung in  $A$  von  $\sigma = \pm 65$ . Der relative Fehler der Einzelmessung betrug  $\sigma / \bar{A} = 0,12$ , der relative Fehler des Mittelwertes  $\sigma / (\sqrt{45} \cdot \bar{A}) = 0,018$  oder etwa 2 %.

### 3.3. Kinetik der Wärmeinaktivierung

Nachdem die bisher beschriebenen Versuche dazu dienten, die optimalen Versuchsbedingungen für die Untersuchung der Kinetik der Wärmeinaktivierung zu ermitteln, werden nunmehr die Versuche besprochen, die das eigentliche Anliegen dieser Arbeit sind. Es handelt sich um die Messung der Geschwindigkeit für die Wärmeinaktivierung in Abhängigkeit von der Inaktivierungszeit und der Temperatur, bei der die Wärmebehandlung erfolgte.

Abb. 12 a zeigt Beispiele typischer Verläufe der zeitlichen Inaktivierung bei den beiden Temperaturen  $54^{\circ}\text{C}$  und  $60^{\circ}\text{C}$ . Die mit  $n$  (nativ) bezeichneten Kurven sind in halblogarithmischer Darstellung durchgebogen. Die mit einer Dosis von 4,5 Mrd vorbestrahlte LDH hatte unmittelbar nach der Bestrahlung und ohne jede Wärmebehandlung nur noch eine Restaktivität von 23 % der unbestrahlten Kontrolle. Normiert man die Restaktivität auf 100 %, wie dies in Abb. 12 a geschehen ist, so darf man aufgrund der stärker durchgebogenen Kurven schließen, daß die LDH-Moleküle, die nach Bestrahlung noch katalytische Eigenschaften besitzen, doch bereits strukturelle Änderungen aufweisen müssen. Hierauf dürfte die größere Hitzelabilität nach Bestrahlung zurückzuführen sein.

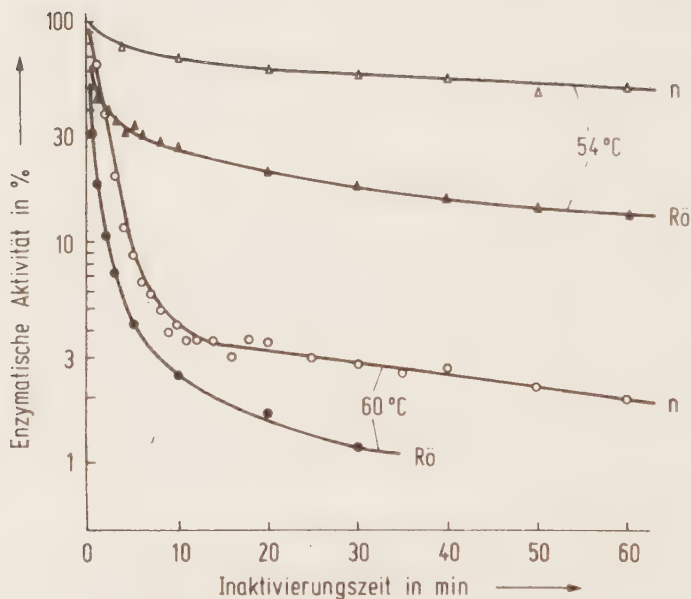


Abb. 12 a: Enzymatische Aktivität von nativer und mit einer Dosis von 4,5 Mrd bestrahlter LDH in Abhängigkeit von der Inaktivierungszeit bis zu 60 Minuten bei Temperaturen von 54°C und 60°C.

In Abb. 12 b ist noch einmal ein Ausschnitt aus Abb. 12 a unter Berücksichtigung der Anfangsabschnitte der bei 60°C erhaltenen Inaktivierungskurven dargestellt. Man erkennt hier noch deutlicher, daß auch für kurze Inaktivierungszeiten im Bereich von Sekunden bis Minuten die Kurven nach Bestrahlung stärker gekrümmt sind als ohne Vorbestrahlung.

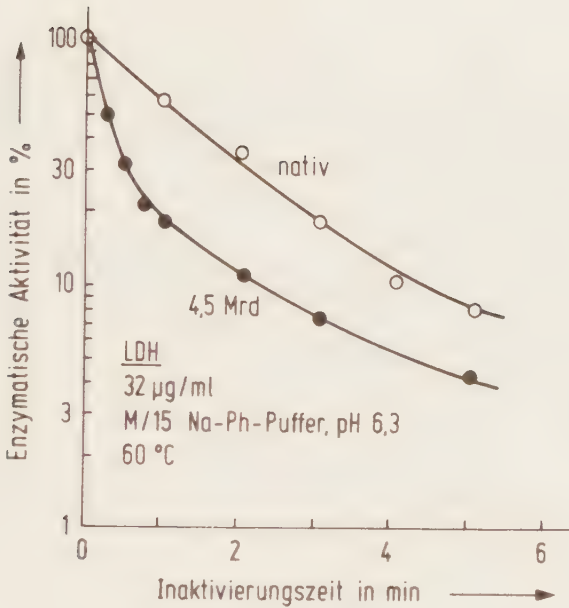


Abb. 12 b: Enzymatische Aktivität von nativer und mit einer Dosis von 4,5 Mrd bestrahlter LDH in Abhängigkeit von der Inaktivierungszeit in den ersten sechs Minuten bei einer Temperatur von 60°C.

In den Abbildungen 13, 14, 15 und 16 ist die Abnahme der enzymatischen Aktivität der LDH in Abhängigkeit von der Inaktivierungszeit graphisch dargestellt. Die Temperatur, bei der die Wärmeinaktivierung erfolgte, ist bei den jeweiligen Kurven angegeben. Abbildung 13 und 15 geben das Verhalten von nativer LDH wieder, während in den Abbildungen 14 und 16 das Verhalten der mit einer Dosis von 4,5 Mrd vorbestrahl-

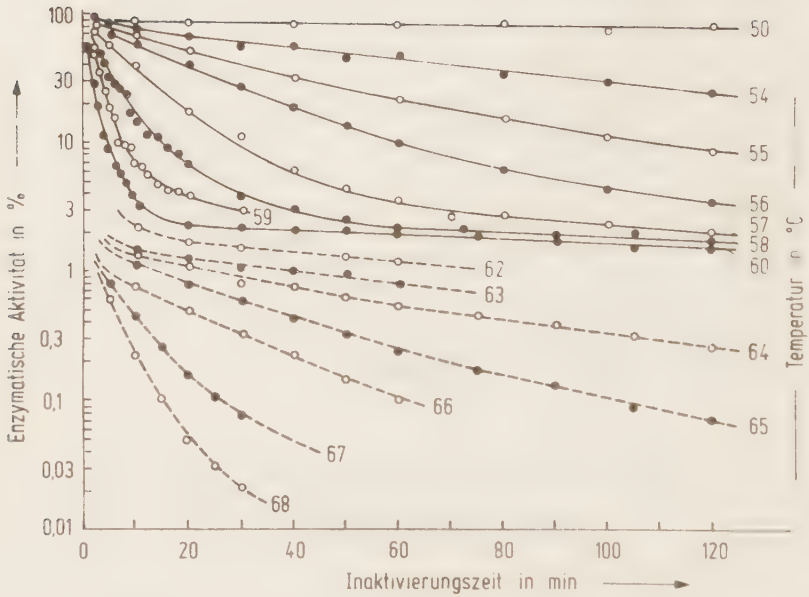


Abb. 13: Enzymatische Aktivität von nativer LDH in Abhängigkeit von der Zeit, während der die LDH bei der jeweiligen, angegebenen Temperatur inaktiviert wurde. M/15 Na-Phosphatpuffer, pH 6,3; 32  $\mu$ g LDH/ml.

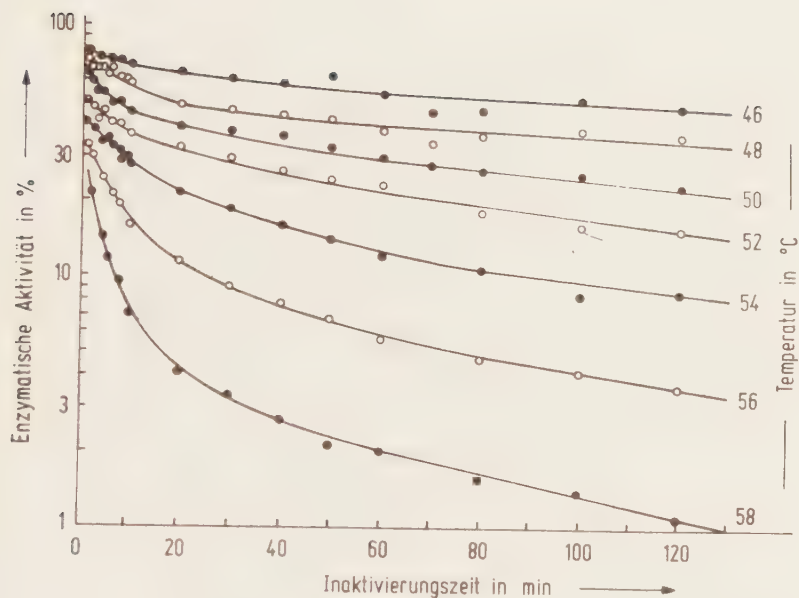


Abb. 14: Enzymatische Aktivität einer vorbestrahlten LDH in Abhängigkeit von der Zeit, während der die LDH bei der jeweils angegebenen Temperatur inaktiviert wurde. Dosis 4,5 Mrd; M/15 Na-Phosphatpuffer, pH 6,3;  $32 \mu\text{g}$  LDH/ml.

ten LDH dargestellt ist.

Der Abbildung 13 kann man entnehmen, daß native LDH unter den hier angegebenen Bedingungen -  $M/15$  Na-Phosphatpuffer, pH 6,3,  $32\mu g$  LDH/ml - bei einer Temperatur von  $50^{\circ}C$  innerhalb von 2 Stunden noch relativ stabil ist. Mit zunehmender Temperatur verliert das Enzym jedoch zunehmend schneller an katalytischer Aktivität. Bei  $60^{\circ}C$  ist nach 10 Minuten nur noch eine Restaktivität von 3 % zu messen. Diese Restaktivität ändert sich jedoch dann nur wenig, so daß selbst nach 2 Stunden noch etwa 1,5 % Restaktivität vorhanden sind. Bei weiterer Erhöhung der Inaktivierungstemperatur verschwindet auch diese geringe, relativ "temperaturunempfindliche Fraktion" mit zunehmender Inaktivierungszeit, so daß bei  $68^{\circ}C$  nach 30 Minuten nur noch ein Aktivitätsrest von 0,03 % gemessen werden kann. Eine Erklärung für diesen merkwürdigen "Bruch" im Verhalten der Restaktivität von etwa 1 - 2 % nach etwa 1 - 2 Stunden bei einer Temperatur unterhalb von etwa  $60^{\circ}C$  steht noch aus. Die halb-logarithmische Darstellung verbirgt jedoch ein wenig die Tatsache, daß der überwiegende Teil der LDH-Aktivität, d. h. 98 bis 99 %, ein relativ einfaches, mit zunehmender Temperatur monotones Verhalten zeigt.

In Abb. 13 wurde der anfängliche Aktivitätsabfall bei Temperaturen zwischen  $62^{\circ}C$  und  $68^{\circ}C$  der Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet. Die hier fehlenden Meßwerte konnten jedoch in der "gespreizten" doppellogarithmischen Darstellung der Abb. 15 eingetragen werden. Hier sind die Aktivitäten für Inaktivierungszeiten bis herüber zu 1,5 Sekunden zu entnehmen. Man erkennt in Abb. 15 sehr viel deutlicher als in Abb. 13, daß die Inaktivierung von etwa 98 %

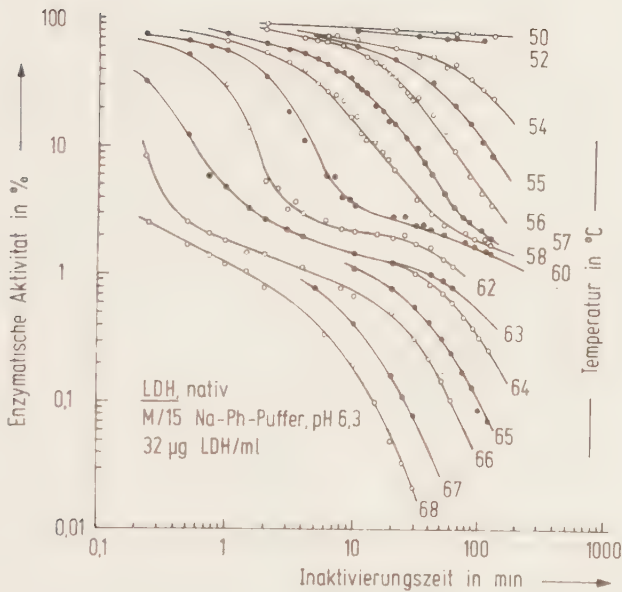


Abb. 15: Zeitliche Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von nativem LDH in doppeltlogarithmischer Darstellung. Die Meßwerte entsprechen denen in Abb. 13. Näheres siehe Text.

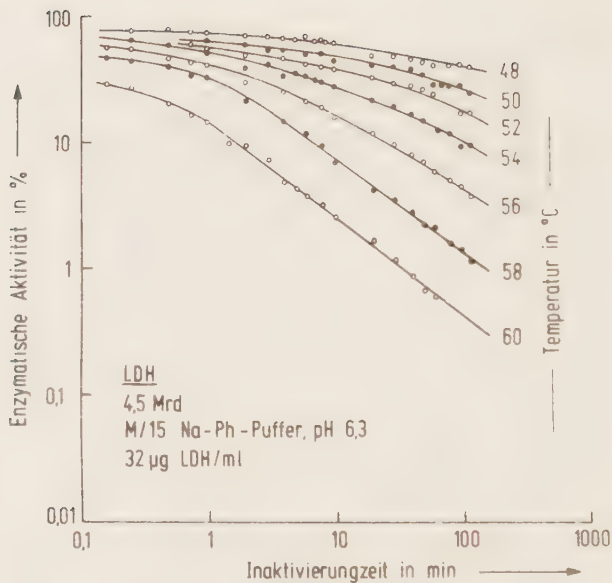


Abb. 16: Zeitliche Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von vorbestrahlter LDH in doppeltlogarithmischer Darstellung. Die Meßwerte entsprechen denen in Abb. 14. Näheres siehe Text.

der LDH einen relativ einfachen monotonen Verlauf hat. Der Rest von etwa 2 % zeigt bei Temperaturen zwischen  $62^{\circ}\text{C}$  und  $68^{\circ}\text{C}$  ein vom Hauptteil deutlich getrenntes Verhalten.

Aus Abb. 14 geht das entsprechende Verhalten vorbestrahlter LDH hervor. Die nach Bestrahlung und ohne Wärmebehandlung gemessene Aktivität wurde auf 100 % normiert. Zunächst scheint die Kinetik der Wärmeinaktivierung für vorbestrahlte LDH von der der nativen nicht sehr verschieden zu sein. Die Temperaturstabilität dieser vorbehandelten LDH ist jedoch geringer als die der nativen LDH (siehe Abb. 12). Dies findet seinen Ausdruck in der Tatsache, daß bereits bei einer Temperatur von  $46^{\circ}\text{C}$  eine deutliche Inaktivierung stattfindet, während native LDH bei dieser Temperatur stabil ist. Außerdem erkennt man in Abb. 14 eine relativ kleine Fraktion von etwa 20 %, die sehr temperaturempfindlich ist, so daß selbst bei der niedrigen Temperatur von  $46^{\circ}\text{C}$  schon nach weniger als einer Minute dieser Anteil inaktiviert ist. Aus Abb. 16, in der wegen der doppeltlogarithmischen Darstellung besonders der Anfang der Wärmeinaktivierungskurve "gespreizt" ist, geht hervor, daß dieser besonders temperaturempfindliche Anteil schon nach weniger als einer Sekunde inaktiviert wurde. Abgesehen von diesem sehr temperaturempfindlichen Anteil von etwa 20 % zeigt jedoch der Hauptteil der LDH-Aktivität - wie aus den Abbildungen 14 und 16 hervorgeht - ein relativ einfaches, monotones Verhalten.

#### 4. Analyse der Ergebnisse

Ein Vergleich von Abb. 13 und 14 zeigt, siehe auch Abb. 12 a und Abb. 12 b, daß die enzymatisch noch aktive Fraktion von 23 %, die eine Bestrahlung mit einer Dosis von 4,5 Mrd "überlebt" hat, im untersuchten Temperaturbereich hitzelabiler ist als native LDH. Da eine bei einer bestimmten Temperatur gemessene Inaktivierungskurve für vorbestrahlte LDH (Abb. 14) nicht durch Multiplikation der Zeit-Skala mit einer einzigen Zahl in die entsprechende Inaktivierungskurve der nativen LDH (Abb. 13) überführt werden kann, kann die Zunahme der Hitzelabilität nach Bestrahlung bei einer bestimmten Temperatur auch nicht durch eine einzelne Zahl vollständig charakterisiert werden.

Man erhält jedoch ein anschauliches Maß für die schnellere Inaktivierung mit zunehmender Temperatur für das native und vorbestrahlte Protein, wenn man die Zeit betrachtet, die benötigt wird, um z. B. 70 % der enzymatischen Aktivität zu zerstören. Diese Zeit ist in Abb. 17 als Funktion der Temperatur aufgetragen. Man erkennt, daß ein einfacher Zusammenhang vorliegt.

Im untersuchten Temperaturbereich wird vorbestrahlte LDH etwa 10 mal schneller inaktiviert als native LDH. Diese Aussage gilt auch für den Vergleich von Inaktivierungszeiten, wenn die Restaktivität nicht 30 %, sondern 40 %, 20 % oder 10 % beträgt. Die Abhängigkeit ist ebenfalls exponentiell. Auch die Kurven sind nahezu parallel. Lediglich ihr Abstand voneinander ist bei 40 % Restaktivität etwas größer als bei der in Abb. 17 dargestellten Abhängigkeit für den Fall von 30 % Restaktivität. Bei einer Restaktivität von 20 % oder 10 % ist der Abstand der beiden Geraden etwas geringer als der in Abb. 17.

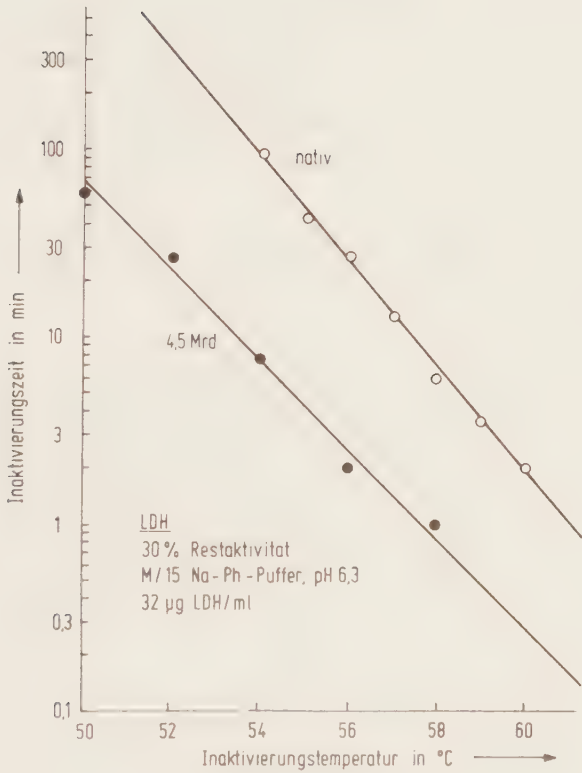


Abb. 17: Abhängigkeit der Zeit für die Inaktivierung von 70 % der enzymatischen Aktivität sowohl für native wie für vorbestrahlte LDH von der Inaktivierungstemperatur.

Wäre die hier gemessene Hitzeinaktivierung eine monomolekulare oder pseudomonomolekulare Reaktion, so würde die enzymatische Aktivität exponentiell mit der Inaktivierungszeit abnehmen. In den halblogarithmischen Darstellungen der Abbildungen 13 und 14 sollte man lineare Abhängigkeiten finden. Alle Kurven sind jedoch nach unten konvex. Formal kann man diese Kurvenverläufe durch die Funktion

$$(3) \quad \frac{A}{A_0} = \sum_{i=1}^n a_i \cdot e^{-k_i t}$$

beschreiben.

In dieser Gleichung bedeutet  $A_0$  die enzymatische Aktivität vor der Wärmebehandlung,  $A$  die enzymatische Aktivität nach der Zeit  $t$ , während der bei einer bestimmten Temperatur die Inaktivierung erfolgte.  $a_i$  sind zunächst formale Koeffizienten. Es liegt jedoch nahe, diese mit den Anteilen von enzymatischen Fraktionen zu identifizieren, die jeweils nach einer Reaktion 1. Ordnung inaktiviert werden. Die der jeweiligen Fraktion mit dem Anteil  $a_i$  zugehörigen temperaturabhängigen Geschwindigkeitskonstanten sind mit  $k_i$  bezeichnet. Die Summe läuft über alle Fraktionen. Formal kann man jede der Inaktivierungskurven in den Abbildungen 13 und 14 durch obige Formel beschreiben, wenn man die Zahl  $n$  hinreichend groß wählt und für die "Anteile"  $a_i$  passende Zahlen einsetzt.

Wenn auch in einer Reihe von Veröffentlichungen (6, 19, 20, 32, 33, 35) gezeigt wird, daß nach Bestrahlung von chromatographisch einheitlichen Enzymproteinen neben chromatographisch verschiedenen inaktiven Fraktionen zwar enzymatisch aktive, aber chromatographisch verschiedene Fraktionen existieren, so ist doch das oben erwähnte,

recht formale Verfahren der "Kurvenanpassung" unbefriedigend. Es kann nämlich gezeigt werden\*, daß bei den hier vorliegenden experimentellen Fehlern die Zuordnung der  $a_i$ 's und  $k_i$ 's nicht eindeutig ist. Man kann nämlich vom experimentellen Standpunkt aus sehr befriedigende Anpassungen mit sehr verschiedenen Sätzen von Wertepaaren  $a_i$  und  $k_i$  erhalten.

Aus diesem Grunde wurde - abweichend von dem mathematisch korrekteren und umständlicheren Verfahren bei der Analyse der Ergebnisse von Versuchen zur Hitzeinaktivierung des Enzyms Invertase (7, 27) - ein sehr vereinfachtes Verfahren zur reaktionskinetischen Analyse der Kurven in Abb. 13 und 14 angewandt. Es wurde die Steigung der Kurven zu Beginn der Hitzeinaktivierung ermittelt. Die durch die Anfangsteile der Kurven gelegten Geraden (siehe Abb. 18) decken sich innerhalb der Fehlergrenzen über einen relativ großen Teil der Kurven recht befriedigend. Die Geraden schneiden die Ordinate in der Nähe des Wertes 100 %. Aus Gl. (3) folgt, daß für die auf diese Weise ermittelte "scheinbare" Geschwindigkeitskonstante  $k'$  die Beziehung

$$(4) \quad k' = \frac{\sum_{i=1}^n a_i}{\sum_{i=1}^n k_i}$$

gilt. Diese Behandlung ist dann sinnvoll, wenn ein Glied der Summe in Gl. (4) wesentlich größer ist als die restlichen Glieder der Summe oder wenn eine Reihe von Werten für  $k_i$  ihrem Wert und ihrer Temperaturabhängigkeit nach so zusammengefaßt werden kann, daß ein "effektives" Sömmenglied entsteht, auf das die oben erwähnte Voraussetzung zutrifft. Da aus Abb. 18 hervorgeht, daß der

\*Herrn Prof. W. Schüßler, Vorstand des Instituts für Nachrichtentechnik der Universität Erlangen-Nürnberg, danke ich für die freundlicherweise durchgeführten mathematischen Untersuchungen

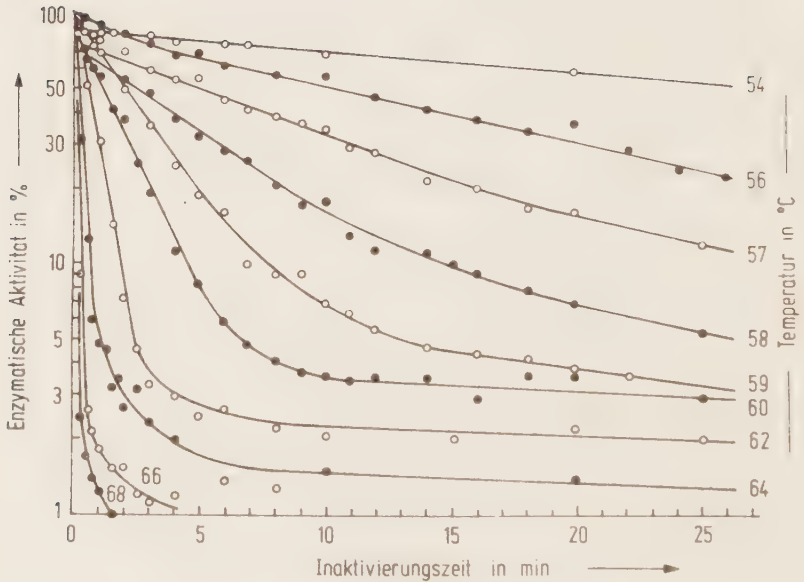


Abb. 18: Enzymatische Aktivität nativer LDH in Abhängigkeit von der Inaktivierungszeit bei verschiedenen Inaktivierungstemperaturen. Diese Abbildung ist ein Ausschnitt aus Abb. 13. Es sind die Anfangsneigungen eingezeichnet, aus denen  $k'$  (siehe Abb. 20) ermittelt wurde.  $32 \mu\text{g}$  LDH/ml,  $M/15$  Na-Phosphatpuffer, pH 6,3.

Kurvenverlauf über einen relativ weiten Bereich für die enzymatische Aktivität einer Exponentialfunktion gehorcht - im Temperaturintervall zwischen 57°C und 68°C sind es mehr als 70 % -, scheint diese vereinfachte Behandlung vernünftig zu sein.

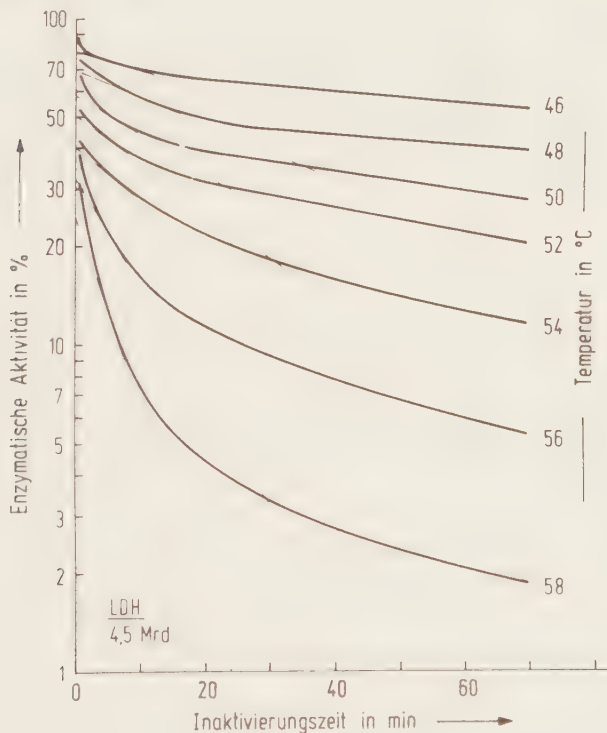


Abb. 19: Enzymatische Aktivität bestrahlter LDH in Abhängigkeit von der Inaktivierungszeit bei verschiedenen Inaktivierungstemperaturen. Diese Abbildung ist ein Ausschnitt aus Abb. 14. Die gekrümmten Kurven wurden gemessen. Die Meßpunkte sind der besseren Übersicht wegen nicht eingezeichnet. Aus den eingezeichneten Geraden wurde unmittelbar  $k'$  (siehe Abb. 20) berechnet. Näheres siehe Text. 32  $\mu$ g LDH/ml, M/15 Na-Phosphatpuffer, pH 6,3.

# Tabelle

Scheinbare Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  für die thermische Inaktivierung nativer und bestrahlter Iminohexal-3-Oxalacetat-LDH

M/15 Na-Phosphatpuffer, pH 6,3; 32,4  $\mu$  LDH/ml; Röntgenstrahlendosis 4,5 Mrd.

| Inaktivierungstemperatur<br>in °C | $k'$ in $10^{-4} \cdot \text{sec}^{-1}$ |           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------|-----------|
|                                   | nativ                                   | bestrahlt |
| 46                                | -                                       | 2,2       |
| 48                                | -                                       | 3,2       |
| 50                                | -                                       | 4,9       |
| 52                                | -                                       | 5,8       |
| 54                                | 2,0                                     | 6,7       |
| 56                                | 7,8                                     | 11,9      |
| 57                                | 14                                      | -         |
| 58                                | 30                                      | 20,8      |
| 60                                | 85                                      | -         |
| 62                                | 210                                     | -         |
| 64                                | 550                                     | -         |
| 66                                | 1100                                    | -         |
| 68                                | 1900                                    | -         |

Die auf diese Weise ermittelten scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten für native LDH sind für die verschiedenen Inaktivierungstemperaturen in der Tabelle aufgeführt. Dort sind ebenfalls die "scheinbaren" Geschwindigkeitskonstanten für bestrahlte LDH eingetragen. Sie wurden aus der Steigung der Geraden in Abb. 19 ermittelt. Hier sind - abweichend vom Verhalten nativer LDH - die Inaktivierungskurven auch für kurze Inaktivierungszeiten so gekrümmt (siehe auch Abb. 21), daß nur eine "mittlere" Steigung im Zeitintervall von 0 bis 20 Minuten ermittelt und daraus die in der Tabelle aufgeführten Werte für  $k'$  berechnet wurden.

In Abb. 20 sind nach dem Vorgehen von ARRHENIUS auf halblogarithmischem Raster die Werte für die scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  in Abhängigkeit von der reziproken absoluten Temperatur eingetragen. Man erkennt, daß der Wert von  $k'$  für native LDH eine größere Temperaturabhängigkeit zeigt als der für bestrahlte LDH. Außerdem ist die Abhängigkeit für native und bestrahlte LDH in befriedigender Näherung linear.

Eine Analyse der absoluten Werte für  $k'$  und deren Temperaturabhängigkeit mit Hilfe der Theorie der absoluten Reaktionsgeschwindigkeit von EYRING (13, 17) und Berechnung der Aktivierungsenthalpie, der Aktivierungsentropie und der Gibbs'schen Funktion für die Aktivierung ist wegen der bisher gemachten Näherungen nicht sinnvoll. Die für die vollständige Analyse notwendigen Werte für die absoluten Werte der Geschwindigkeitskonstanten sind - wie aus dem Mittelungsverfahren in Abb. 19 folgt - mit einem erheblichen systematischen Fehler behaftet. Damit wird auch der Wert für die ohnehin nur "effektive" Aktivierungsentropie einen entsprechenden systematischen Fehler aufweisen.

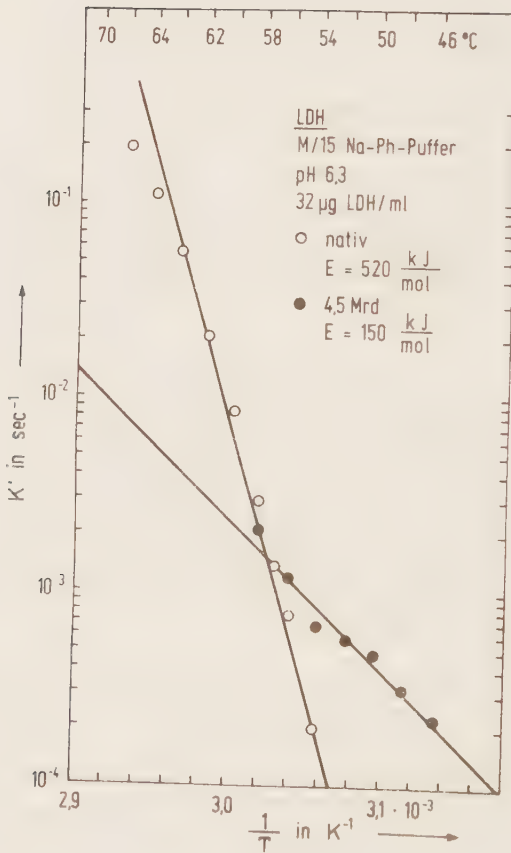


Abb. 20: Abhängigkeit der "scheinbaren" Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  von der reziproken absoluten Temperatur für native und vorbestrahlte LDH.  $k'$  wurde ohne Berücksichtigung zweiter und höherer Fraktionen direkt aus den in Abb. 18 und 19 eingezeichneten Geraden ermittelt.

Anders verhält es sich mit der Temperaturabhängigkeit von  $k'$ . Diese Temperaturabhängigkeit wird nicht verfälscht, wenn die absoluten Werte für  $k'$  bei den verschiedenen Temperaturen mit dem gleichen relativen systematischen Fehler behaftet sind. Dies scheint hier näherungsweise der Fall zu sein. Daher wird der mit Hilfe der ARRHENIUS-Formel

$$(5) \quad \ln k' = \ln k'_0 - E/RT$$

berechnete Wert für die Aktivierungsenergie  $E$  als molekulare Größe betrachtet, die den Inaktivierungsprozeß charakterisiert.

In Gl. (5) bedeutet  $k'_0$  eine Konstante,  $R$  die Gaskonstante und  $T$  die absolute Temperatur. Der Wert für  $E$  unterscheidet sich nur durch das additive Glied  $RT$  von der Aktivierungsenergie der EYRING'schen Theorie.

Für native LDH erhält man aus der Steigung der Geraden in Abb. 20 einen Wert für  $E$  von 520 Kilojoule pro Mol oder 125 Kilocalorien pro Mol; für bestrahlte LDH erhält man die wesentlich kleineren Werte 150 Kilojoule pro Mol oder 35 Kilocalorien pro Mol.

## 5. Diskussion

Die bisher beschriebenen Experimente zeigten, daß sich an Lactatdehydrogenase nach Einwirkung von ionisierenden Strahlen zwei Effekte nachweisen lassen. Beim ersten Effekt handelt es sich um einen sofortigen Verlust der enzymatischen Aktivität eines von der Strahlendosis (siehe Abb. 11) abhängigen Anteils der Enzymprobe. Nur ein Teil der enzymatischen "Anfangsaktivität" kann unmittelbar nach der Bestrahlung noch nachgewiesen werden. Dieser Effekt wurde an zahlreichen Enzymproteinen (3, 4, 5, 23, 24) nachgewiesen. Einige ältere (15, 32, 36), aber besonders neuere Untersuchungen (1, 25) zeigen, daß auch noch ein weiterer Effekt nachzuweisen ist. Es muß nämlich die noch enzymatisch aktive Fraktion des Enzymproteins ebenfalls durch die Einwirkung von ionisierenden Strahlen erhebliche molekulare Veränderungen aufweisen. So ist die nach einer Bestrahlung noch vorhandene enzymatisch aktive Fraktion von Katalase wesentlich hitzelabiler als die unbestrahlte Katalase (16). Der gleiche Effekt konnte an Invertase nachgewiesen werden (7, 27). In diesem Falle war der Effekt sehr ausgeprägt. Die in Trockenhefe nach Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 20 Mrd noch vorhandene enzymatisch aktive Fraktion wurde in einem weiten Temperaturbereich 1000 mal schneller hitzeinaktiviert als das unbestrahlte Enzympräparat. Die Analyse der Hitzeinaktivierungskurven ergab, daß diese erhöhte Inaktivierungsgeschwindigkeit auf eine durch Bestrahlung verursachte Vergrößerung der Aktivierungsentropie für die Hitzeinaktivierung zurückzuführen ist (7, 27).

Auch die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente an LDH zeigen, daß der noch enzymatisch aktive Anteil von etwa 23 %, der nach einer Röntgenstrahlendosis von 4,5 Mrd nachgewiesen werden kann, ebenfalls wärmelabiler ist. Dies ging aus den graphischen Darstellungen der Abbildungen 12

bis 16 hervor, insbesondere aus der in Abb. 17 dargestellten effektiven Halbwertszeit von der Inaktivierungstemperatur.

Im vorhergehenden Abschnitt wurde bereits begründet, warum die reaktionskinetische Analyse nicht von der fundamentalen Theorie der absoluten Reaktionsgeschwindigkeit nach EYRING (13) Gebrauch macht, sondern von der älteren und mehr phänomenologischen Beziehung von ARRHENIUS. Es zeigte sich, daß die in Gl. (4) definierten effektiven Geschwindigkeitskonstanten  $k'$  tatsächlich der von ARRHENIUS gefundenen Beziehung der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten gehorcht (siehe Abb. 20). Für die Aktivierungsenergie  $E$  ergab sich für unbestrahlte LDH ein Wert von 520 Kilojoule pro Mol oder 125 Kilocalorien pro Mol. Dieser Wert ist typisch für die Hitzedenaturierung einer großen Zahl von Proteinen (Joly). Die Temperaturabhängigkeit der effektiven Geschwindigkeitskonstanten für den aktiven Rest einer bestrahlten LDH-Probe ist jedoch völlig anders. Für  $E$  ergab sich hier ein Wert von 150 Kilojoule pro Mol oder 35 Kilocalorien pro Mol.

Da unbestrahlte LDH eine mit den verschiedenen Methoden - z. B. der Gelchromatographie - nachweisbare homogene Population von Proteinmolekülen darstellt, ist die Anwendung der Beziehung von ARRHENIUS zur Ermittlung von  $E$  sinnvoll. Dafür spricht auch der aus Abb. 18 ersichtliche, in halblogarithmischem Raster lineare Teil der Zeit-Inaktivierungskurven, der sich über einen breiten Aktivitätsbereich erstreckt. Völlig anders liegen die Verhältnisse bei einer bestrahlten LDH. Selbst für sehr kurze Inaktivierungszeiten sind die entsprechenden Kurven (siehe Abb. 12 b, 14, 19 und 21) gekrümmt. Die Wärmeinaktivierung folgt auch nicht näherungsweise einer monomolekularen oder pseudo-monomolekularen Funktion. Das in Abb. 19 demonstrierte

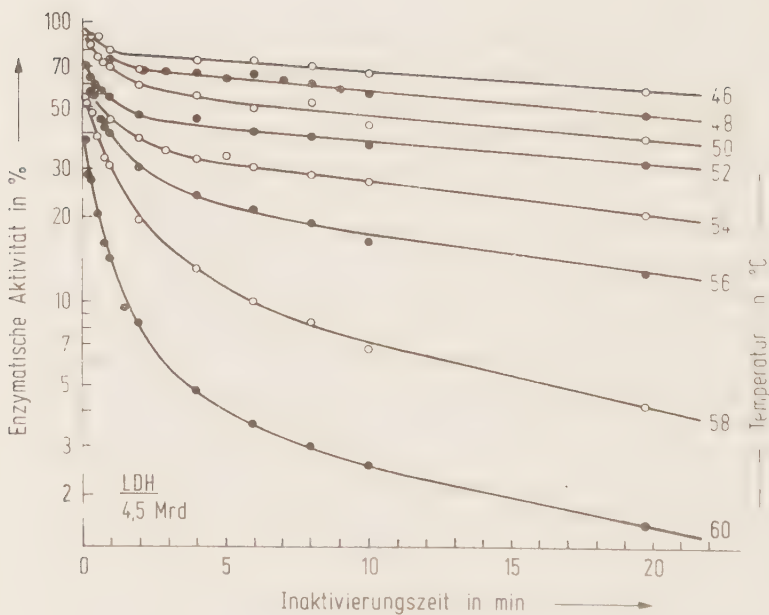


Abb. 21: Enzymatische Aktivität bestrahlter LDH in Abhängigkeit von der Inaktivierungszeit in den ersten 20 Minuten bei verschiedenen Inaktivierungstemperaturen.

Mittelungsverfahren über die ersten 20 Minuten der Wärmeinaktivierung kann nur eine mittlere "effektive" Aktivierungsenergie ergeben. Die starke Krümmung der Zeit-Inaktivierungskurven bei bestrahlter LDH dürfte nach den derzeit vorliegenden Kenntnissen über die Strahlenwirkung auf Proteine Ausdruck der strahlenbedingten molekularen Veränderungen mit teilweiser Entfaltung der Peptidketten mit

Aggregatbildung und anderer Veränderungen sein. Es konnte gezeigt werden (6, 22, 25, 34), daß nach Bestrahlung verschiedener einheitlicher Proteine eine Vielzahl von chromatographisch und elektrophoretisch nachweisbaren Fraktionen entsteht. Jede Fraktion sollte - sofern sie tatsächlich einheitlich ist - eine spezifische Aktivierungsenergie bzw. -enthalpie und eine spezifische Aktivierungsentropie besitzen. Diese könnten in entsprechenden Versuchen mit reiner Fraktion bestimmt werden.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wärmeinaktivierung von Lactatdehydrogenase nach Röntgenbestrahlung untersucht. Eine 1 %ige LDH-Kristallsuspension in 2.2. M Ammoniumsulfat wurde mit 60 kV-Röntgenstrahlen bestrahlt. Die mit optischer Methode bestimmte LDH-Aktivität zeigte eine exponentielle Dosisabhängigkeit. Die Halbwertsdosis betrug 2,15 Mrd.

Sowohl unbestrahlte als auch mit einer Dosis von 4,5 Mrd bestrahlte LDH wurde nach Lösung in M/15 Phosphatpuffer pH 6,3 bei einer Konzentration von  $32,4 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$  Enzymprotein pro ml bei Temperaturen zwischen  $46^{\circ}\text{C}$  und  $68^{\circ}\text{C}$  wärmeinaktiviert und die zeitliche Abnahme der Enzymaktivität gemessen. Es zeigte sich, daß die anfängliche Wärmeinaktivierung der nativen LDH befriedigend durch eine Reaktion 1. Ordnung beschrieben werden kann. Mit Hilfe der Beziehung von ARRHENIUS wurde eine Aktivierungsenergie von  $520 \text{ kJ/Mol}$  ermittelt.

Der zeitliche Verlauf der Restaktivität von etwa 25 % nach einer Dosis von 4,5 Mrd ist dagegen zu keinem Zeitpunkt durch eine Reaktion 1. Ordnung beschreibbar. Der zeitliche Verlauf kann durch eine Summe von Exponentialfunktionen beschrieben werden. Dieser Summe entspricht wahrscheinlich das nach Bestrahlung chromatographisch nachweisbare Spektrum von Molekülfractionen der LDH. Die einzelnen Unterfraktionen entsprechen den Gliedern der Summe der Exponentialfunktionen zur Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Wärmeinaktivierung. Aus der Temperaturabhängigkeit einer mittleren Geschwindigkeitskonstante wurde eine mittlere Aktivierungsenergie ermittelt. Diese betrug  $150 \text{ kJ/Mol}$ . Die Aktivierungsenergie ist nur halb so groß wie die der nativen LDH. Dies ist als Ausdruck erheblicher strahlen-

bedingter Veränderungen der nativen Struktur der LDH bei noch vorhandener enzymatischer Aktivität zu betrachten. Diese Strukturveränderungen können als eine Art von "Prädenaturierung" betrachtet werden, da nunmehr für die thermische Denaturierung nur eine wesentlich geringere Aktivierungsenergie aufzuwenden ist.

## 7. Literatur

- 1 Adams, G.E. und R.L. Willson, R.H. Bisby und R.B. Cundall:  
Int. J. Rad. Biol. 20, 405 (1971)
- 2 Attix, F.H., Roesch, W.C.:  
Radiation Dosimetry.  
Academic Press, New York, Band I, S. 143 (1968)
- 3 Augenstein, L.G.:  
Symposium on Information Theory in  
Biology (eds. Jockey, Platzmann u. Quastler)  
p. 287, Pergamon Press, New York (1958)
- 4 Braams, R.:  
Rad. Res. Proc. 3<sup>rd</sup> Int. Congress of Rad. Res.  
(1966)  
Herausgeber Silini, North-Holland Publ. Comp.  
Amsterdam
- 5 Dale, W.M.:  
Hollaender, A. (ed.): Radiation Biology,  
Bd. I, S. 255. McGraw-Hill Book Co., New  
York (1954-1956)
- 6 Denkl, C.P.:  
Zur Strahleninaktivierung der Lactatdehydroge-  
nase in wässriger Lösung.  
Dissertation. Medizinische Fakultät der  
Universität Erlangen - Nürnberg (1971)
- 7 Eggert, Ch.:  
Über die Hitzedenaturierung von Invertase  
nach Röntgenbestrahlung.  
Dissertation. Medizinische Fakultät der  
Universität Erlangen - Nürnberg (1969)
- 8 Eidus, L.Kh.:  
Physikalisch-chemische Untersuchung des Mecha-  
nismus der Inaktivierung von Fermenten. III.  
Thermodynamische Analyse der strukturemi-  
schen Veränderungen bei der Strahleninaktivie-

rung am Kaninchen.

Vorträge der Akademie der Wissenschaften

USSR Sektion Biophysik 11, 601-604 (1966)

9 Eidus, L.Kh.:

Biofizika (USSR), 11, 217 (1966)

10 Ganassi, E.E., N.V.Kondakova, G.S.Otarowa, L.Kh.Eidus:

Radiobiologija 1, 14 (1961)

11 Ganassi, E.E., L.Kh.Eidus, R.A.Arifulina:

Radiobiologija 4, 41 (1964)

12 Ganassi, E.E., E.N.Sarch, N.V.Kondakova, L.Kh.Eidus:

Biofizika (USSR) 10, 966 (1965)

13 Glasstone, S., K.J.Laidler and H.Eyring:

The Theory of Rate Processes.

McGraw-Hill, New York (1941)

14 Glocker, R., E.Macherauch:

Röntgen- und Kernphysik für Mediziner und  
Biophysiker.

Thieme-Verlag, Stuttgart, S. 453 (1965)

15 Haskill, J.S. and J.W.Hunt:

Rad. Research 31, 327 (1967)

16 Hollaender, A.(ed):

Radiation Protection and Recovery.

Pergamon Press, Oxford (1960)

17 Johnson, F.H., H.Eyring, M.J.Polissar:

The Kinetic Basis of Molecular Biology.

John Wiley & Sons, Inc., New York, or

Chapman & Hall, Ltd., London (1954)

18 Joly, M.:

A Physico-chemical Approach to the Denatu-  
ration of Proteins.

Academic Press, London and New York (1965)

19 Jung, H., H.Schüssler:

Zur Strahleninaktivierung von Ribonuklease I.

Auftrennung der Bestrahlungsprodukte.

Z.Naturforschung 21 b, 224-231 (1966)

- 20 Jung, H., H.Schüssler:  
Zur Strahleninaktivierung von Ribonuklease  
III. Aminosäuren-Veränderungen nach Bestrahlung im Trockenem.  
Z.Naturforschung 23 b, 934-943 (1968)
- 21 Kalabukhova, T.N., N.V.Kondakova, L.Kh.Eidus:  
Studia biophysica 7, 1 (1968)
- 22 Kunigk, K.:  
Untersuchungen an Lactatdehydrogenase nach  
Röntgenbestrahlung in Lösung.  
Dissertation. Medizinische Fakultät der  
Universität Erlangen - Nürnberg (1973)
- 23 Little, C., T.Sanner, A.Pihl:  
X-ray modification of the catalytic and  
allosteric functions of fructose-1,  
6-diphosphatase.  
Biochim.Biophys.Acta 178, 83-92 (1969)
- 24 Luse, R.A.:  
Rad.Res.Suppl. 4, 192 (1964)
- 25 Müller, E.:  
Über die Bestimmung von SH-Gruppen an nativer  
und bestrahlter Lactatdehydrogenase.  
Dissertation. Medizinische Fakultät der  
Universität Erlangen - Nürnberg (1973)
- 26 NBS Handbook 85:  
Physical Aspects of Irradiation.  
US Government Printing Office (1962)
- 27 Paulz, H., Ch.Eggert:  
Thermal Inactivation of Invertase after  
X-irradiation.  
Studia biophysica 7, 31-36 (1968)
- 28 Pollard, E., W.F.Powell, S.H.Reaume:  
The Physical Inactivation of Invertase.  
Proc.Nat.Acad.of Sciences 38, 173-180 (1952)

- 29 Setlow, R.B.:  
The Inactivation of Catalase by Deuterons and Heat.  
Arch.Biochem.Biophys. 33, 396-408 (1951)
- 30 Silini, G.(ed):  
Radiation Research.  
North-Holland Publ.Co., Amsterdam (1967)
- 31 Schmidt, Th.:  
Kalorimetrische Messung der Energieflußdichte weicher Röntgenstrahlen.  
Dissertation. Erlangen (1971)
- 32 Schüssler, H., H.Jung:  
Zur Strahleninaktivierung von Ribonuklease II. Aminosäure-Zusammensetzung der Bestrahlungsprodukte.  
Z.Naturforschung 22 b, 614-621 (1967)
- 33 Schüssler, H.:  
Biophysik, im Druck
- 34 Schüssler, H. und P.Denkl:  
Int.J.Radia.Biol. 21, 435 (1972)
- 35 Shapira, R.:  
Int.J.Rad.Biol. 7, 538 (1963)
- 36 Slobodian, E., W.Newman, M.Fleisher, S.Rubenfeld:  
Biochim.Biophys.Acta 111, S. 181 (1965)
- 37 Vladimirov, U.A., T.N.Kalabukhova, N.V.Kondakova, N.I.Perasse, L.Kh.Eidus:  
Studia biophysica 7, 1 (1968)
- 38 Winstead, J.A.:  
Rad.Res. 30, 832 (1967)
- 39 Wohlhieter, J.A., A.Buzzel, M.A.Leuffer:  
Biochim.Biophys.Acta 43, 163 (1960)



Meinen Eltern

Herrn Professor Dr. Dr. H. Pauly  
danke ich herzlich für die freundliche  
Überlassung des Themas dieser Arbeit  
sowie für die gute Betreuung.



Herzlich danken möchte ich allen, die mir  
bei der Fertigstellung dieser Arbeit be-  
hilflich waren.

Mein Dank gilt besonders Frau Dr. H. Schüssler  
für die vielen Ratschläge und Herrn Dr. Th.  
Schmidt für den Abschnitt Dosimetrie.



## Lebenslauf

Am 28. 10. 1943 wurde ich als Sohn des Oberlehrers Alfred Werner und seiner Frau Charlotte, geborene Krause, in Großsteinberg in Sachsen geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule sowie des Neuen Gymnasiums in Nürnberg bestand ich im Sommer 1963 das Abitur. Im Wintersemester 1963 / 1964 begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg das Studium der Medizin und habe im Februar 1970 das Medizinische Staatsexamen bestanden.

Von August 1970 bis Juli 1971 leistete ich die Medizinalassistentenzeit ab. Seit 1. August 1971 war ich nach Erhalt der Approbation als chirurgischer Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus Gerolzhofen tätig.









